

BA

(18) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-157272
(P2000-157272A)

(43)公開日 平成12年6月13日(2000.6.13)

(51) Int.Cl.
C 1 2 N 15/09
C 1 2 Q 1/00
1/68
H 0 1 L 49/00

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00
C 1 2 Q 1/00
1/68
H 0 1 L 49/00

データカード(参考)
4B024
4B063

審査請求 未請求 請求項の数 7 OL (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平10-341604

(22)出願日 平成10年12月1日(1998.12.1)

(71)出願人 000233055

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社
神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

(72) 春明者 伊藤 敏明

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

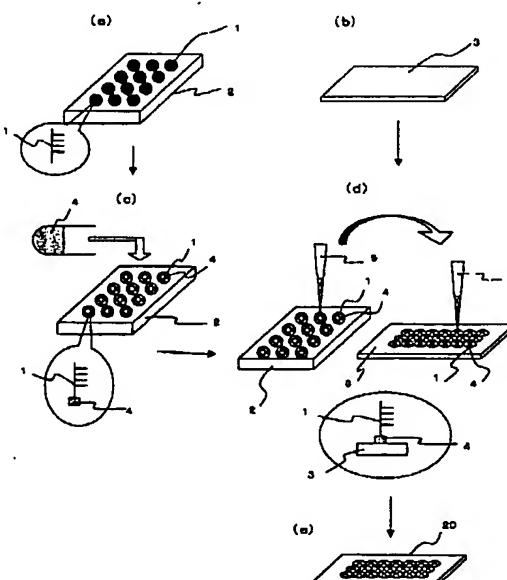
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオチップ及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 プレートのプローブをプロットした以外の部分にサンプルDNAが付着することのないバイオチップを提供する。

【解決手段】 プローブ1と結合剤4とを混合した混合物をプレート3に植え付ける。あるいは、プローブを植え付けるべきプレート上の位置に、先ずプローブとプレートとの結合剤を局所的に付着させ、次に、結合剤が付着しているプレート上の位置にプローブを植え付ける。こうして、プローブをプロットしたか所が異の箇所に結合剤が付着していないバイオチップ20を製造する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレート上の複数の位置にプレートとプローブとを結合させる結合剤を用いてプローブを植え付けたバイオチップにおいて、前記結合剤は前記プローブが植え付けられている位置に局在していることを特徴とするバイオチップ。

【請求項2】 プレートに該プレートとプローブを結合させる結合剤を用いてプローブを植え付けてバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、プローブと結合剤とを混合した混合物をプレートに植え付けることを特徴とするバイオチップの製造方法。

【請求項3】 プレートにプローブを植え付けてバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、プローブを植え付けるべきプレート上の位置に、前記プローブと前記プレートとの結合剤を局所的に付着させるステップと、前記結合剤が付着しているプレート上の位置にプローブを植え付けるステップとを含むことを特徴とするバイオチップの製造方法。

【請求項4】 請求項2又は3記載のバイオチップの製造方法において、前記プレートはガラス製であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

【請求項5】 請求項2～4のいずれか1項記載のバイオチップの製造方法において、ピンヘッドが窪んだピンを用いてプローブを植え付けることを特徴とするバイオチップの製造方法。

【請求項6】 プレートにプローブを植え付けるのに使用されるピンにおいて、プローブを付着させるピンヘッドが窪んでいることを特徴とするピン。

【請求項7】 プレートにプローブを植え付けるのに使用されるピンにおいて、プローブを付着させるピンヘッドに十字型の溝を形成したことを特徴とするピン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、複数種類のプローブをプレートにスポットしたバイオチップに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来から、複数種類のDNA、RNA、たんぱく質等の生体高分子からなるプローブをガラスなどのプレートにスポットして、バイオチップを製造することが行われていた。図4は、この従来の方法の原理を説明する図である。図4(a)に示すように、複数種類のプローブDNA1が入っているマイクロプレート2を用意する。一方、図4(b)に示すよう、プレート3としてガラス板を用意しておき、図4(c)で示すように、プレート3の表面にpoly-l-LysineをDNAとガラスの結合剤4としてコーティングする。この後、図4(d)で示すように、マイクロプレート2に入っているプローブDNA1をピンに付着させ、表面にDNAとガラスの結合剤(poly-l-Lysine)4がコーティングして

あるガラスプレート3の上に、ピン5に付着させたプローブDNA1を接触させてスポットする。マイクロプレート2に入っている全てのプローブDNAをスポットし終わるまでこの作業を繰り返し、図4(e)に示すバイオチップを製造していた。このように、従来はプレートに予めDNAとガラスの結合剤を全面コーティングし、その上にDNAをプロットしてバイオチップを製造していた。

【0003】 図5は、バイオチップを利用したハイブリダイゼーションの原理を説明する図である。図5(a)に示すように、プローブDNA1が結合剤4でガラスのプレート3にスポットされているバイオチップと、蛍光物質10で標識したサンプルDNA11を、ともにハイブリダイゼーション溶液に入れてハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodiumcitrate)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用するDNAの性質により異なる。

【0004】 このとき、サンプルDNA11とバイオチップ上のプローブDNA1が相補鎖DNAであれば、両者は二重らせん構造をとり結合する。一方、両者が相補鎖でなければ結合せず、蛍光物質10で標識したサンプルDNA11がガラスのプレート3上にコーティングされている結合剤4と結合し、ガーベージとして残る。

【0005】 その後、図5(b)に示すように、ガラスのプレート3上に残った蛍光物質10で標識したサンプルDNA11を水12の中に入れて洗い流すと、プローブDNA1と結合していないサンプルDNA11は排出される。その後、図5(c)に示すように、プローブDNAと結合しているサンプルDNAに標識している蛍光物質をランプ14からの光エネルギーで励起させ、蛍光物質が励起して発光する光をCCDなどの光センサー13で検出することでハイブリダイゼーションの検出を行う。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 バイオチップを用いた実験では、バイオチップにサンプルDNAをふりかけ、バイオチップにスポットしてあるプローブDNAとハイブリダイズさせ、どのプローブDNAとサンプルDNAが結合したかを検出している。検出の前処理として、ハイブリダイズしたあとに、結合しなかったサンプルDNAを排除するためにバイオチップを水で洗っている。しかし、プレートにDNAとガラスの結合剤を全面コーティングしているため、プローブDNAと結合しなかったサンプルDNAが必要以外の部分、すなわち、プローブDNAがスポットされていない結合剤部分に張り付き、結合剤4と結合しているサンプルDNA11は水洗いによってもガラスのプレート3上から除去されない。それが検出時ノイズとなって現われ、感度が低くなっていた。つま

り、サンプルDNAの一部がプローブDNAとの特異結合ではなく単に結合剤4に張り付いた状態でバイオチップ上にガーベージとして残り、そのサンプルDNAに標識されている蛍光物質も励起されて発光するため、ノイズとして検出され、S/Nが悪くなるという問題があつた。

【0007】本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みなされたもので、プレートのプローブをプロットした以外の部分にサンプルDNAが付着することのないバイオチップを提供すること、及びそのバイオチップの製造方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するため、本発明では、プローブをスポットするプレート上の特定部分にだけプローブとガラスの結合剤を付着させる。すなわち、プレートにプローブをスポットした部分以外にはプローブとガラスの結合剤を付着させないため、サンプルDNAを入れてハイブリダイズさせた後、プローブと結合しなかったサンプルDNAは水で洗い流せばチップ上から無くなるため、検出時ノイズが無くなりS/Nの向上させることができ、高感度となる。

【0009】すなわち、本発明によるバイオチップは、プレート上の複数の位置にプレートとプローブとを結合させる結合剤を用いてプローブを植え付けたバイオチップにおいて、結合剤はプローブが植え付けられている位置に局在していることを特徴とする。

【0010】本発明によるバイオチップの製造方法は、プレートに該プレートとプローブを結合させる結合剤を用いてプローブを植え付けてバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、プローブと結合剤とを混合した混合物をプレートに植え付けることを特徴とする。

【0011】本発明によるバイオチップの製造方法は、また、プレートにプローブを植え付けてバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、プローブを植え付けるべきプレート上の位置に、プローブとプレートとの結合剤を局所的に付着させるステップと、結合剤が付着しているプレート上の位置にプローブを植え付けるステップとを含むことを特徴とする。プレートはガラス製とすることができる。また、ピンヘッドが窪んだピンを用いてプローブを植え付けるのが好ましい。

【0012】本発明のピンは、プレートにプローブを植え付けるのに使用されるピンにおいて、プローブを付着させるピンヘッドが窪んでいることを特徴とする。本発明のピンは、また、プレートにプローブを植え付けるのに使用されるピンにおいて、プローブを付着させるピンヘッドに十字型の溝を形成したことを特徴とする。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施形態について説明する。ここでは、プローブとしてDNAを用いる場

合について説明する。しかし、プローブとして用いることができるものはDNAに限られず、RNAあるいはたんぱく質をプローブとして用いることもできる。また、プレートとしてガラスプレートを用いた例で説明するが、ガラス以外にナイロン製のメンブレン等も使用可能である。

【0014】図1は、本発明の第1の実施の形態の原理を説明する図である。図1(a)に示すように、マイクロプレート2には複数種類のプローブDNA1が入っている。図1(b)に示すように、バイオチップのプレートとしてはガラスのプレート3を使用する。図1(c)に示すように、DNAとガラスとの結合剤4をマイクロプレートの各ウェルに分注し、プローブDNA1と混合する。DNAとガラスとの結合剤4としては、例えばpoly-L-Lysineあるいはカルボジイミドを用いることができる。

【0015】次に、図1(d)に示すように、結合剤4とプローブDNA1を混ぜたものをピン5で吸い上げ(もしくは溶液をピン5の先に付着させて)、プレート3にスポットする。この処理をマイクロプレート2に入っているすべてのプローブDNAに対して繰り返し行うことで、図1(e)に示すように、必要な部分にのみ結合剤4が付着し、プローブをスポットした以外の部分には結合剤4が付着していないバイオチップ20を作ることができる。

【0016】図2は、本発明の第2の実施の形態の原理を説明する図である。図2(a)に示すように、マイクロプレート2にはプローブDNA1が入っている。図2(b)に示すように、バイオチップのプレートとしてガラスプレート3を使用する。図2(c)に示すように、結合剤4を例えば毛細管6で吸い上げ、ガラスプレート3上のプローブDNAをスポットする位置に吐き出す。こうすることで、ガラスプレート3上のプローブDNA1をスポットする位置に、予め結合剤4をスポットして付着させておく。その後、図2(d)に示すように、マイクロプレート2に入っているプローブDNA1を結合剤4でフォーマットされたプレート3に、ピン5で吸い上げ(もしくはピン5に溶液を付着させて)繰り返しスポットする。こうして、図2(e)に示すように、必要な部分にのみ結合剤4が付着し、プローブをスポットした以外の部分には結合剤4が付着していないバイオチップ20を作ることができる。

【0017】図6に、本発明で用いたピン5のヘッド形状を示す。図6(a)に示したピン5aは、ヘッド部分、すなわちプローブを付着させる部分がアーチ型に窪んだピンである。また、図6(b)に示したピン5bは、ヘッド部分がアーチ型に窪み、さらに窪みの中に十字型に溝を切ったピンである。ピンのヘッドをアーチ状に窪ませることで、スポットするプローブの中にピンを入れたときに表面張力でうまくピンヘッドにプローブ溶

液が吸い込まれるしくみになっている。アーチの深さは任意である。このピンを使うことで、ヘッドが平坦な従来のピンを用いる場合より、プレートへのDNAスポット量を約10倍に増やすことができる。図6 (c) に示したピン5cは、平坦なヘッドの表面に十字型に溝を切ったものである。このピンによってもヘッドが単に平坦な従来のピンに比較してスポット量を増やすことができる。

【0018】図3は、本発明によるバイチップを利用したハイブリダイゼーションの原理を説明した図である。図3 (a) に示すように、プローブDNA 1 が結合剤4でガラスプレート3にスポットされているバイチップ20と、蛍光物質10で標識したサンプルDNA 11を、ともにハイブリダイゼーション溶液に入れてハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodium citrate)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用するDNAの性質により異なる。

【0019】このとき、サンプルDNA 11とバイチップ上のプローブDNA 1 が相補鎖DNAであれば、両者は二重らせん構造をとり結合する。一方、両者が相補鎖でなければ結合せず、蛍光物質10で標識したサンプルDNA 11がガラスのプレート3上にガーベージとして残る。図3 (b) に示すように、ガラスのプレート3上に残った蛍光物質10で標識したサンプルDNA 11を水12の中に入れて洗い流すと、ガラスとDNAは結合が弱いため、ガーベージのサンプルDNA 11が排出され、ガラスのプレート3上から無くなる。図3 (c) に

示すように、ハイブリダイゼーションの検出は結合しているサンプルDNAに標識している蛍光物質をランプ14の光で励起させ、蛍光物質が励起して発光する光をCCD等の光センサー13で検出する。このとき、バイオチップ20上にガーベージのサンプルDNAが無いため、検出のS/N比が向上する。

【0020】

【発明の効果】本発明によると、プローブをスポットする部分のみに結合剤を付着させたバイオチップを製造することができ、バイチップ読み取り時、検出感度を向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるバイオチップの製造方法の一例を説明する図。

【図2】本発明によるバイオチップの製造方法の他の例を説明する図。

【図3】本発明のバイチップを用いたハイブリダイゼーションと検出の説明図。

【図4】従来のバイオチップの製造方法を説明する図。

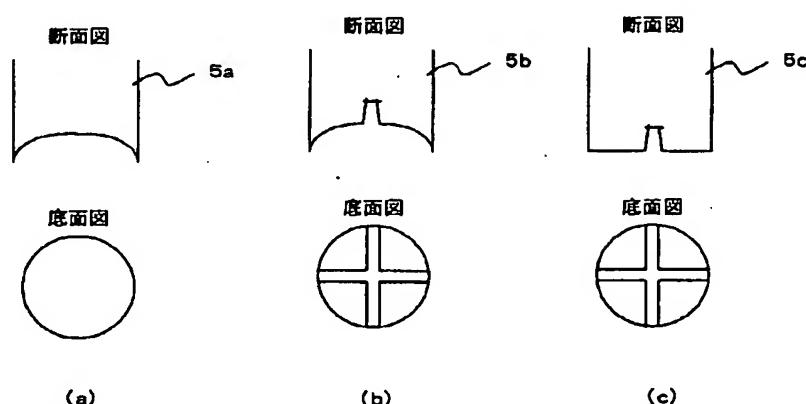
【図5】従来のバイチップを用いたハイブリダイゼーションと検出の説明図。

【図6】本発明によるプローブ付着用のピンの説明図。

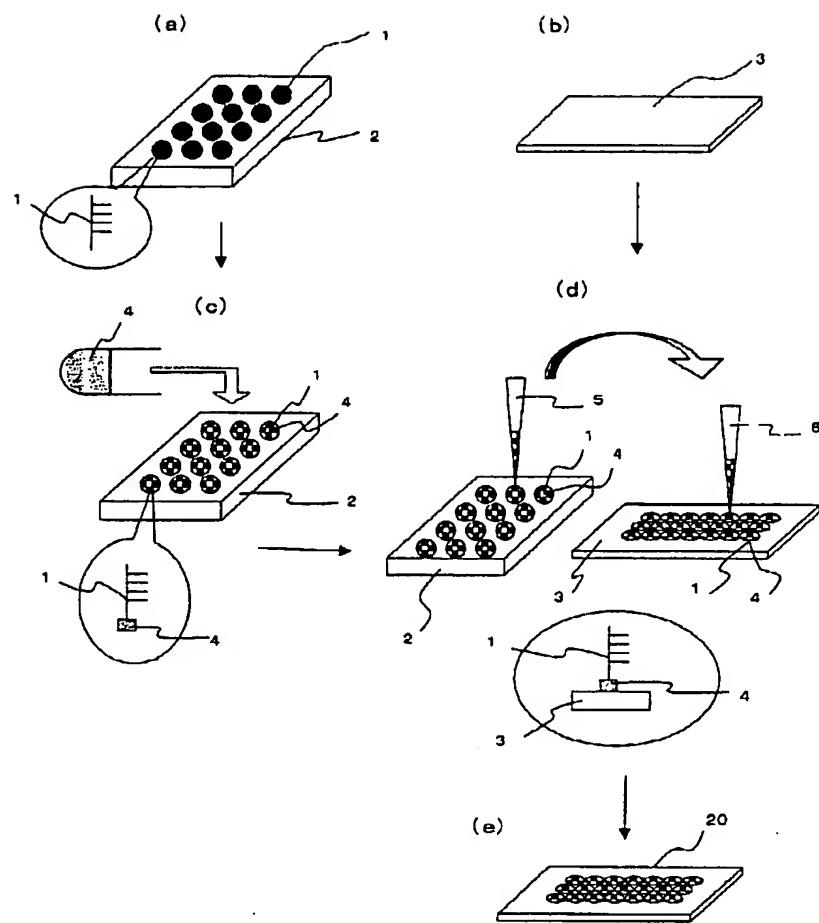
【符号の説明】

1…プローブDNA、2…プローブ格納用マイクロプレート、3…ガラスのプレート、4…結合剤、5…ピン、6…毛細管、10…蛍光物質、11…サンプルDNA、12…水、13…光センサー、14…ランプ、20…バイオチップ。

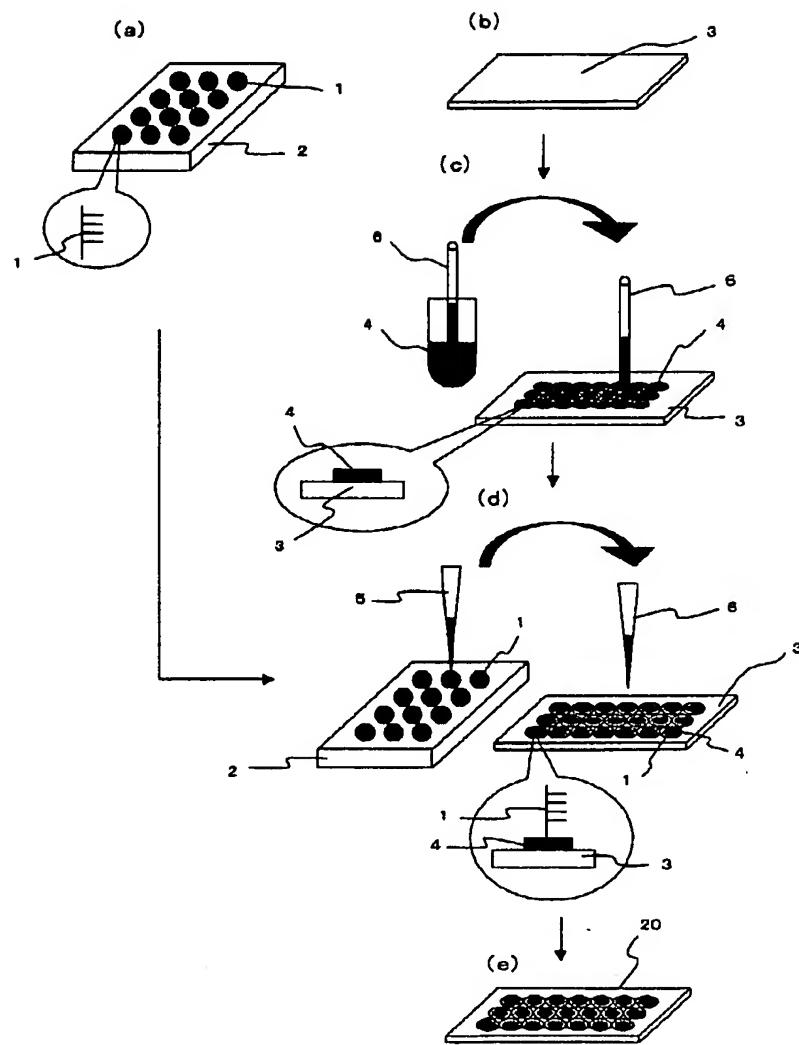
【図6】



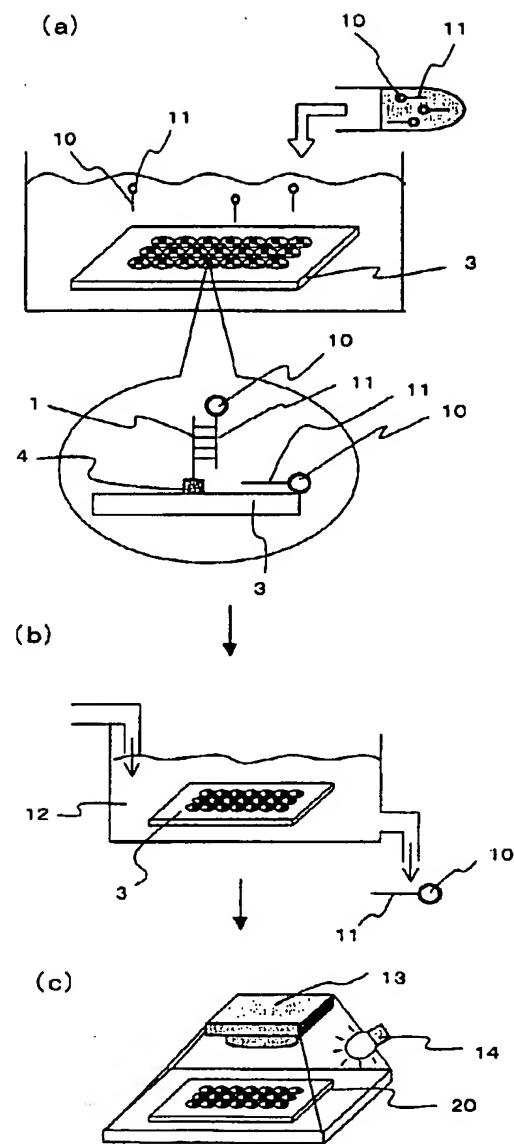
【図1】



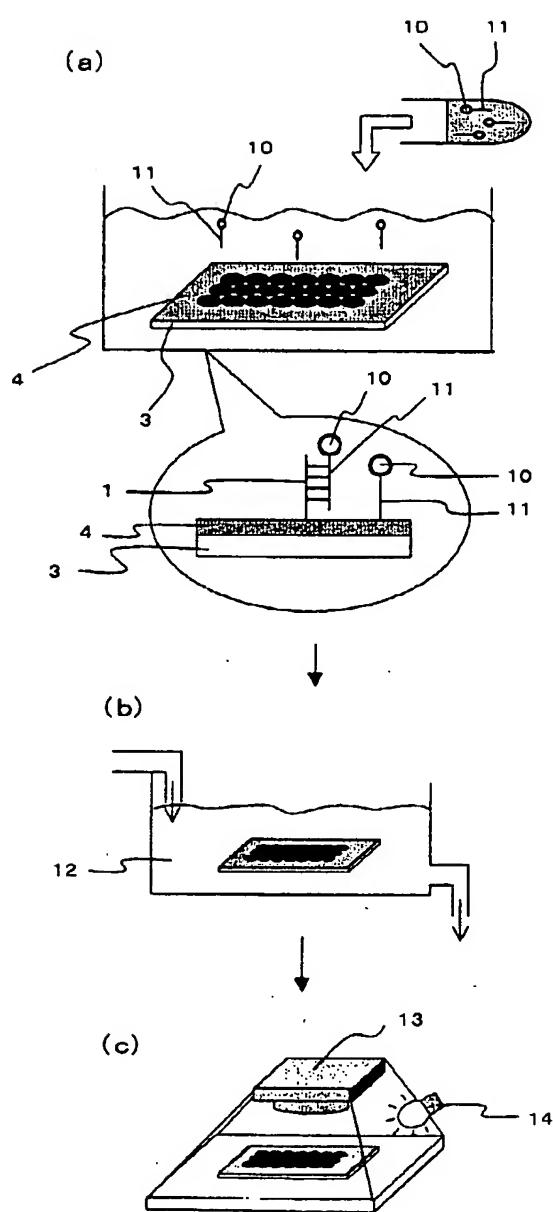
【図2】



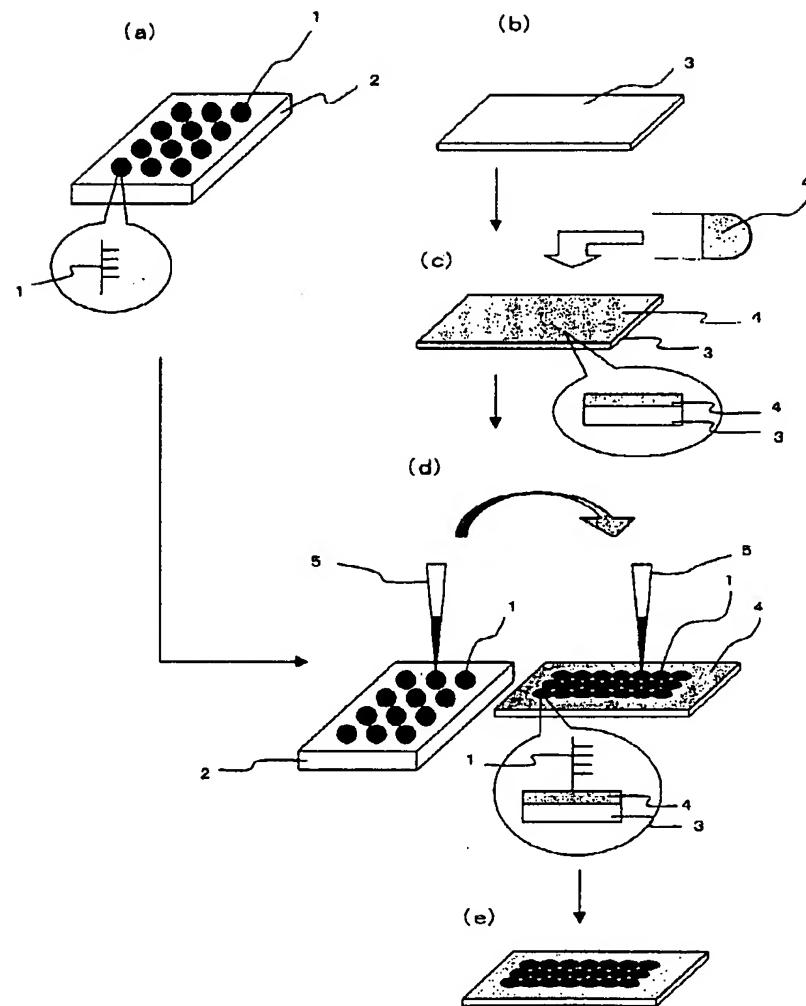
【図3】



【図5】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 山本 顕次

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内

(72)発明者 渡辺 敏正

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内

(72)発明者 百合野 以子

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内

F ターム(参考) 4B024 AA20 CA09 HA20

4B063 QA01 QQ42 QQ62 QR32 QR35
QR55 QS32